



(19) SU (11) 1490961 (13) A1
(51) 5 C 12 N 15/52

СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР (ГОСПАТЕНТ СССР)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к авторскому свидетельству

1

- (21) 4262311/13
(22) 170687
(31) 22739
(32) 14.10.86
(33) HU
(46) 150794 Бюл. № 13
(71) Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР: Ветэкс Контрактор Лтд (HU)
(72) Фодор И.И., Мельников А.А., Янош Молнар (HU); Петер Хорват (HU)
(56) Kotewicz et al Gene, 35, 249, 1985.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА
(57) Изобретение относится к генетической инженерии. Согласно предлагаемому способу ко-

2

дирующий обратную транскриптазу рой-ген ДНК вируса саркомы Рауса встраивают в плазмидный вектор экспрессии, в частности в рUC 9, непосредственно за lac-промотором, полученные фрагменты используют для трансформации бактерий EscoI после чего отбирают рекомбинантную ДНК обладающую набором последовательностей обеспечивающих репрессию и индукцию вирусного рой-гена связывание его МРНК с рибосомой, а также последовательностью инициации и терминации трансляции. Полученной рекомбинантной ДНК трансформируют EscoI клетки бактерий разрушают и фермент очищают монообменной хроматографией.

SU

1490961

A1

Изобретение относится к биотехнологии и молекулярной биологии, а именно к способу получения фермента обратной транскриптазы вируса саркомы Рауса (RSV).

Способ заключается в том, что кодирующий обратную транскриптазу рои-ген выделенный из ДНК вируса саркомы Рауса, встраивают с помощью лигазы в плазмиду с большим числом копий таким образом, чтобы указанный ген находился в плазмиде непосредственно за lac-промотором, который может быть репрессирован и легко индуцирован. Полученной лигазной смесью затем трансформируют *E. coli*, после чего отбирают трансформированные клетки, несущие ДНК с набором последовательностей, обеспечивающих подавление и экспрессию вирусного рои-гена, связывание его МРНК с рибосомой, а также с последовательностями, обеспечивающими инициацию и терминацию трансляции. Рекombинантной плазмидой трансформируют *E. coli*, бактериальные клетки после индукции разрушают и извлеченный сырой фермент — обратную транскриптазу подвергают очистке.

Пример 1. Получение плазмидной ДНК.

6 мкг ДНК плазмиды pSRA-2 подвергают последовательно обработке рестриктазами *Xma*I, *Xho*I и *Pst*I. Проверку эффективности расщепления электрофорезом в агарозном геле производят после каждого гидролиза.

Также выполняют гидролиз ферментами *Pst*I и *Sal*I 2 мкл ДНК pUC 9.

Обе ДНК подвергают осаждению 96%-ным этанолом и трехкратной промывке 70%-ным этанолом. Каждую из двух осажденных фракций растворяют в 20 мкл лигирующего буфера.

Смесь, приготовленную из 280 нг расщепленной ДНК pUC 9 и 1350 нг расщепленной ДНК pSRA-2, дополняют необходимыми компонентами и после добавления 10 единиц лигазы оставляют на ночь в холодильнике при 8°C.

С помощью лигазной смеси (5–10 мкл) проводят трансформацию клеток штамма бактерий *E. coli* HB 101, предварительно обработанных CaCl_2 . Клетки растирают на агарных пластинках, приготовленных с питательной средой LB и дополненных 0,5% глюкозы и 20 мкл/мл ампициллина. После инкубации в течение 18 ч при 37°C проводят анализ выращенных колоний, определяют размер содержащейся в них плазмиды.

Отбирают штаммы, содержащие исконую плазмиду размером в 5,5 кб. (pMF 14). Эти клетки выращивают в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу и ампицил-

лин, затем производят выделение плазмиды. Плазмиду проверяют с помощью рестриктаз (*Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI, *Hind* III), а также их сочетаний и сопоставляют с оригинальной картой рои-гена.

Отобранный клон далее используют для тестирования фермента, поступая при этом следующим образом.

2 мл культуры, выращенной за ночь на питательной среде LB с глюкозой и ампициллином, используют для посева в 20 мл указанной среды, и проводят инкубацию при энергичном встряхивании при 37°C. При достижении плотности E_{600} 1,0 к культуре добавляют свежеприготовленный водный раствор IPTG, доводя концентрацию последнего до 1 мМ, и продолжают инкубацию еще в течение 60 мин.

Собранные центрифугированием клетки обрабатывают лизоцимом и лизирующим раствором.

Лизирующий раствор:

1% Triton X-100

0,2% NP-40

1 мМ EDTA (этилендиаминтетрацетат)

2 мМ DTT (дитиотреитол)

2 мМ PMSF

10 мМ фосфата натрия (рН 8,0)

Разрушают сферопласты. Прозрачную фракцию, полученную в количестве 200–400 мкл, непосредственно используют для тестирования ферментативной активности.

Проверенный, продуцирующий обратную транскриптазу клон выращивают и индуцируют синтез белка, продукт из культуры выделяют с целью характеристики фермента.

Пример 2. Препаративное выделение обратной транскриптазы.

800 мл культуры *E. coli* HB 101, содержащей плазмиду pMF 14, выращивают на питательной среде LB с добавленной глюкозой (0,5%) и ампициллином (100 мкг/мл) до достижения плотности 2,2.

После центрифугирования клетки суспендируют в 50 мл питательной среды M9, не содержащей глюкозы, но содержащей ампициллин. После инкубации с энергичным встряхиванием в течение 30 мин добавляют IPTG до достижения концентрации 10 мМ, затем продолжают инкубацию еще в течение 90 мин. Собранные центрифугированием клетки замораживают жидким азотом и до обработки хранят при -20°C.

Все операции по выделению фермента проводят при 4°C.

Замороженные клетки суспендируют в 8 мл 10%-ного раствора сахарозы, содержащего 1 мМ фосфата натрия (рН 8,0), и к суспензии добавляют 2 мл раствора лизоци-

ма в этом же фосфатном буфере с концентрацией 20 мг/мл. Спустя 10 мин наплаивают 11 мл лизирующего раствора и два слоя осторожно перемешивают. Полученный раствор подвергают центрифугированию при 100000 g в течение 1 ч, затем к верхнему слою добавляют пятимолярный раствор NaCl до достижения конечной концентрации 0,1 M (в данном примере для этого к 43,5 мл верхнего слоя следует добавить 870 мкл 5 M раствора NaCl) и этот раствор наносят на колонку с DE 32 размерами 2x12 см, уравновешенную буфером А (10% глицерина, 5% сахарозы, 0,2% NP-40, 10 mM фосфата натрия, pH 8,0, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 0,1 M NaCl).

Бета-субъединица обратной транскриптазы не сорбируется на носителе, в то время как значительная часть ДНК-полимеразы, а также нуклеиновые кислоты, мешающие последующим хроматографическим разделениям, оказываются сорбированными.

Колонку промывают буфером А до тех пор, пока несорбируемое вещество полностью смывается (экстинкция элюата A_{230} 0,1), и пропущенный раствор (140 мл) подвергают диализу трижды по 4 ч против 1 л буфера Б.

Буфер Б:

10% глицерина
0,2% NP-40 (ионидет Р-40)
10 mM фосфата натрия (pH 8,0)
1 mM DTT
0,5 mM EDTA
0,1 mM PMSF

Полученный после диализа продукт наносят на колонку с фосфоцеллюлозой P11 размерами 2x20 см. Колонку промывают буфером Б до снижения экстинкции до A_{230} 0,1 (в данном примере на это потребуется 200 мл буфера), затем через колонку пропускают градиент буфера Б в режиме 0,01–1,0 M, собирая фракции объемом 4 мл.

Из каждой фракции отбирают пробу объемом 3 мкл для определения активности обратной транскриптазы. Активные фракции, элюированные в интервале 0,25–0,33 M, собирают и объединенный элюат подвергают диализу в течение 3x8 ч против 3x2 л буфера В.

Буфер В:

10% глицерина
0,2% NP-40
1 mM DTT
0,5 mM EDTA
10 mM фосфата калия (pH 8,0)

После диализа вещество наносят на колонку с DE 32 размерами 1x5 см, несорбируемые вещества смывают буфером В.

Обратную транскриптазу затем элюируют буфером В, содержащим 0,5 M KCl, собирают фракции объемом 0,4 мл. Активность обратной транскриптазы во фракциях определяют, отбирая из них пробу объемом 1 мкл.

Объединенные активные фракции (около 3 мл) подвергают диализу в течение 18 ч против буфера Г.

10 Буфер Г:

50% глицерина
50 mM фосфата калия (pH 8,0)
50 mM KCl
1 mM DTT
0,5 mM EDTA

В результате описанных процедур очистки получается 1 мл раствора обратной транскриптазы, обладающего активностью 20 ед/мкл.

20 Суммарное количество фермента, вырабатываемого из 800 мл исходной бактериальной культуры, составляет таким образом около 20000 ед.

25 П р и м е р 3. Препарат в состоянии поддерживать синтез ДНК в стандартной реакционной смеси в течение не менее 2 ч. Денатурирующий гелеэлектрофорез РНК не показывает изменений при инкубации РНК с препаратом, полученным согласно предлагаемому способу, в течение 4 ч. Это доказывает, что очищенная рекомбинантная обратная транскриптаза не содержит неспецифических нуклеаз.

35 Рекомбинантная обратная транскриптаза синтезирует поли dT в системе затравка – матрица rA/dT₄₅ как в присутствии ионов Mg⁺⁺, так и в присутствии ионов Mn⁺⁺.

40 Оптимальная концентрация этих ионов составляет 3 и 2 mM соответственно. Наличие этих ионов в концентрации 6 mM приводит к незначительному снижению скорости реакции.

45 Фермент выполняет свои функции также в системе затравка – матрица поли rCm/олиго⁴⁶, но лишь в присутствии Mn⁺⁺. Активность фермента на этом субстрате составляет около 25% от активности, измеряемой на классическом субстрате поли rA/dT.

55 В системе поли A⁺ мРНК/олиго dT (т.е. при синтезе κДНК) оптимальная для фермента концентрация Mg⁺⁺ составляет 6 mM, тогда как концентрация Mn⁺⁺ составляет 2 mM, 7,5 ед.акт. фермента включают [3H]dTTP в количестве, соответствующем образованию 0,8–1,6 нмоль κДНК. Размер получаемого продукта составляет 200–1600

нуклеотидов в случае поли А мРНК дрож-
 филлы и 400-7000 нуклеотидов в случа зна-

чительно более длинной гетерогенной ядер-
 ной поли А* РНК печени крысы.

Формула изобретения

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАТНОЙ
 ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА САРКОМЫ
 РАУСА, заключающийся в том, что в плаз-
 миду рUC9 непосредственно за lac-промо-
 тором с помощью лигазы встраивают Pst-
 XhoI-фрагменты плазмиды рSRA-2, пол-
 ученной смесью ДНК трансформируют
 клетки E.coli, после чего по устойчивости к
 антибиотику отбирают трансформирован-
 ные клетки, из которых выделяют ДНК, за-

5 тем из них по молекулярной массе отбира-
 ют ДНК, которая содержит набор последо-
 вательностей, обеспечивающих репрессию и
 экспрессию вирусного pol-гена и связыва-
 ние его мРНК с рибосомой, а также после-
 10 довательности, инициирующие и термини-
 рующие трансляцию, затем выделенной
 рекомбинантной ДНК трансформируют
 клетки E.coli HB 101, после культивирова-
 ния бактериальные клетки разрушают и
 15 выделяют обратную транскриптазу ионо-
 обменной хроматографией

Редактор Л. Павлова

Составитель А. Спундз
 Техред М.Моргентал

Корректор О. Кравцова

Заказ 441

Тираж
 НПО "Поиск" Роспатента

Подписное

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101